

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Taksonomi Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juli 1999.

B. Alat dan Bahan

1. Alat :

No	Nama	Kegunaan
1.	Pisau	memotong-motong kulit jeruk
2.	Blender	menggiling kulit jeruk
3.	Botol maserasi	tempat proses maserasi
4.	Kertas saring	penyaring
5.	Kain kasa	penyaring
6.	Erlenmeyer	tempat maserat dan distilat
7.	Evaporator putar	menguapkan pelarut
8.	Distilator	distilasi
9	Corong pisah	memisahkan antara fraksi minyak dan air
10.	Pipet tetes	memindahkan bahan-bahan cair
11.	Kuas	memindahkan hewan uji
12.	Stoples	tempat unit perlakuan
13.	Kertas tissue	menyerap air dari media uji
14.	Mikroskop binokuler	perbesaran hewan uji untuk membedakan
		antara jantan dan betina

2. Bahan :

No	Nama	Kegunaan
1.	Kulit buah jeruk <i>Citrus nobilis</i>	bahan ekstrak
2.	Imago <i>Sitophilus oryzae</i> jantan dan betina	hewan uji
3.	Etanol	pelarut ekstrak
4.	Larutan tween 20	pencampur bahan antara ekstrak dan aquades
5.	aquades	pengencer bahan uji
6.	beras pecah kulit	media uji
7.	Kalium Iodin/yodium	membedakan warna media uji dan larva
9.	Eter	pemisah fraksi air dan minyak
10.	Natrium Sulfat	mengeringkan fasa organik dalam minyak

C. Cara Kerja

1. Pengadaan Serangga Uji

Serangga uji diperoleh melalui rearing dengan menempatkan 100 imago serangga uji dalam wadah berukuran 2 liter. Mediana berupa beras pecah kulit yang diisikan sampai 2/3 wadah (Smith & Mangkoewidjojo, 1998). Rearing dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Taksonomi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pengadaan Ekstrak Kulit Buah *Citrus nobilis* dengan Maserasi Etanol

Bahan ekstraksi berupa kulit buah *C. nobilis* diperoleh dari warung-warung makan yang menyediakan minuman jeruk di daerah Tembalang, Semarang.

Kulit buah *C. nobilis* dikering-anginkan pada suhu kamar, agar senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya tidak menjadi rusak oleh sinar matahari. Pengeringan dilakukan pada udara yang tidak disirkulasikan agar kehilangan minyak pada bahan tersebut dapat dihindari (Guenther, 1987). Setelah kering, kulit dipotong-potong dengan pisau dan selanjutnya digiling dengan blender sampai menjadi serbuk. Kemudian serbuk segera dimaserasi dengan pelarut polar etanol 95 % selama 3 - 4 hari pada suhu kamar untuk menarik semua senyawa yang terkandung dalam serbuk (Harbone, 1987). Setelah 3 - 4 hari dilakukan penyaringan terhadap maserat yang dihasilkan dan ditampung di dalam erlenmeyer. Penyaringan diulang beberapa kali sampai maserat menjadi bening (Suyitno, 1989). Maserat ini kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator putar agar pelarutnya menguap pada suhu 40 - 50° C untuk memisahkan senyawa dengan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat.

3. Pengadaan Ekstrak Kulit Buah *Citrus nobilis* dengan Distilasi Uap - Air

Pada distilasi uap-air (*water and steam distillation*) ini, sampel kulit jeruk dipotong-potong berukuran kecil, sekitar 1 cm persegi (Cahyono, 1999; Kurnia, 1998). Selanjutnya ke dalam ketel distilasi yang di bawahnya telah disiapkan pemanas, dimasukkan potongan-potongan kulit jeruk dan diletakkan di atas rak-rak atau saringan berlubang. Saringan ini diletakkan di atas dasar tangkai dan di bawahnya adalah air. Air diisikan sampai permukaan air tersebut berada tidak jauh dari bawah saringan (Guenther, 1987; Supriyanto & Supriyadi, 1991).

Ketel distilasi kemudian dihubungkan dengan kondensor. Aliran air yang masuk ke dalam kondensor diatur agar tidak terlalu keras. Agar kondensor ini lebih dingin, maka ditambahkan es batu dan garam., tujuan utama aliran ini adalah transfer panas (Cahyono, 1999).

Kondensor kemudian dihubungkan dengan adapter agar hasil distilasi dapat masuk ke dalam labu distilat dengan mudah. Distilat yang terkumpul kemudian dipindah ke dalam corong pisah dan ditambahkan larutan eter. Corong pisah ini dikocok dengan sempurna. Setelah minyak dan fraksi airnya terpisah, maka minyak diambil dengan pipet dan fraksi airnya ditampung. Fasa organik dalam minyak dikeringkan dengan natrium sulfat (Cahyono, 1999). Fraksi air kemudian diberi larutan eter, kemudian diuapkan pelarutnya dengan evaporator putar dengan penggunaan tekanan 40 mmHg.

4. Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Buah *Citrus nobilis* Terhadap Mortalitas *Sitophilus oryzae*

Penentuan Batas-batas LC5 - LC90. Penentuan batas-batas ini dilakukan untuk mengetahui kisaran LC5 - LC90 konsentrasi yang akan digunakan untuk uji selanjutnya. Batas-batas LC5 - LC90 adalah konsentrasi perlakuan yang mengakibatkan kematian sebanyak 5 % dan 90 % dari jumlah populasi serangga yang diuji. Kriteria mati di sini adalah hewan uji dalam kondisi kaku dan jika disentuh tidak memberikan reaksi. Caranya dengan menentukan lima tingkatan konsentrasi dari ekstrak bahan uji ditambah perlakuan kontrol dan diulang satu kali (Koestoni, 1985). Ekstrak bahan uji diberikan dengan perlakuan semprot terhadap beras sebagai pakan serangga uji (racun perut). Konsentrasi bahan uji

yang dipakai adalah 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 persen (v/v). Bahan uji ekstrak dengan maserasi etanol dibuat dengan mengencerkan ekstrak kental etanol dengan aquades dan 1 % larutan tween 20 sebagai pencampur bahan, dan bahan uji ekstrak distilasi uap - air dibuat dengan mengencerkan distilat dengan etanol.

Serangga uji adalah imago *Sitophilus oryzae* sebanyak 20 ekor. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase mortalitas serangga dari setiap perlakuan pada 6, 12, 24, ..., 120 jam.

Penentuan LC50 dan Pengujian Mortalitas. Penentuan LC50 dilakukan berdasarkan batas-batas LC5 - LC90 terhadap mortalitas serangga uji. LC50 adalah konsentrasi perlakuan yang mengakibatkan kematian sebanyak 50 % dari jumlah populasi serangga yang diuji. Caranya dengan menentukan lima tingkatan konsentrasi ditambah satu perlakuan kontrol dengan diulang tiga kali setiap perlakuan (Koestoni, 1985). Ekstrak bahan uji diberikan dengan perlakuan semprot terhadap beras sebagai pakan hewan uji. Konsentrasi uji yang digunakan adalah lima tingkatan konsentrasi ditambah satu perlakuan kontrol berdasarkan batas-batas LC5 - LC90, yaitu konsentrasi 0,0; 7,0; 9,0; 11,0; 15,0; 19,0 persen (v/v) untuk maserasi etanol dan 0,0; 5,0; 7,0; 9,0; 12,0; 15,0 persen (v/v) untuk distilasi uap-air. Interval lima tingkatan konsentrasi yang digunakan ini dihitung berdasarkan rumus Hubert (1979 dalam Widyastuti 1999), yaitu :

$$\text{Log} \frac{N}{n} = k \left(\log \frac{a}{n} \right)$$

dimana, N : nilai konsentrasi ambang atas

n : nilai konsentrasi ambang bawah

a : nilai konsentrasi terkecil yang digunakan pada uji penentuan LC 50

k : jumlah konsentrasi yang akan diujikan

Setelah nilai a diperoleh kemudian dilakukan penghitungan terhadap tingkatan konsentrasi yang lain dengan rumus :

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d}$$

Semua tingkatan konsentrasi yang diperoleh (a, b, c, d, e) digunakan untuk uji penentuan LC50 dan uji mortalitas. Jumlah serangga uji setiap perlakuan sebanyak 20 ekor. Pengamatan dilakukan dengan menghitung serangga yang mati dari setiap perlakuan pada 6, 12, 24, ..., 120 jam. Nilai LC50 diperoleh dengan Analisis Probit Bushvine-Nash (Koestoni, 1985). Pengujian mortalitas bertujuan untuk mengetahui banyaknya mortalitas yang terjadi berdasarkan pada penentuan LC50 melalui tahap-tahap yang dilakukan pada uji penentuan LC50 tersebut.

5. Pengujian Perkembangan *Sitophilus oryzae*

Untuk mengetahui perkembangan serangga uji, maka diperlakukan dengan bahan ekstrak di bawah nilai LC50. Uji ini dengan menggunakan lima tingkatan konsentrasi perlakuan dan satu kontrol. Setiap perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

Pengamatan Jumlah Larva dan Jumlah Imago. Dalam mengamati jumlah larva dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- dipersiapkan stoples sebagai media uji yang masing-masing diisi 20 gram beras pecah kulit yang diberi perlakuan semprot dengan konsentrasi 0,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0 persen (v/v) untuk maserasi etanol dan konsentrasi 0,0; 5,5; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 persen (v/v) untuk distilasi uap - air.
- ke dalam masing-masing stoples tersebut dimasukkan tiga pasang serangga uji.
- pada hari ke dua puluh semua serangga induk diambil dan 10 gram beras diambil secara acak untuk diamati larvanya. Biji beras sebelumnya direndam dalam air, sisa air yang menempel diserap dengan kertas tissue, kemudian beras dipecah dan diamati di bawah mikroskop binokuler (Shazali, 1982; Holloway, 1985 dalam Nurkholis 1995). Agar perbedaan warna antara larva dan beras menjadi jelas, maka biji beras diberi campuran 1 gram yodium, 2 gram kalium iodin, dan 300 cc aquades.
- Sedangkan 10 gram sisanya tetap dibiarkan dalam media uji untuk dipergunakan selanjutnya dalam pengamatan jumlah imago.
- dilakukan penghitungan terhadap jumlah imago yang muncul dari media uji, dihitung pula persentase larva yang berkembang menjadi imago.

Pengamatan Lamanya (Waktu) Daur Hidup. Dalam mengamati lamanya daur hidup dilakukan dari waktu memasukkan serangga uji ke dalam media uji sampai dengan munculnya imago.

D. Parameter

1. Mortalitas

Mortalitas ini dihitung berdasarkan banyaknya hewan uji yang mati pada setiap perlakuan.

2. Perkembangan

Jumlah Larva. Jumlah larva dihitung berdasarkan banyaknya larva yang dihasilkan dari setiap perlakuan.

Persentase Larva yang Menjadi Imago. Larva yang berkembang menjadi imago dihitung berdasarkan rumus :

$$P = \frac{\sum i}{\sum l} \times 100 \%$$

dimana, P : Persentase larva yang menjadi imago

$\sum i$: Jumlah imago yang muncul

$\sum l$: Jumlah larva

Lama Waktu Daur Hidup. Lama daur hidup dihitung berdasarkan waktu pada saat memasukkan serangga uji sampai dengan munculnya imago dari media uji.

E. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data mortalitas, jumlah larva, jumlah imago, persentase jumlah larva yang menjadi imago, dan lama daur hidup dianalisis dengan ANOVA. Apabila terdapat perbedaan antara perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf uji 5 % (Gomez & Gomez, 1995). Untuk mengetahui toksisitas (LC50) bahan uji, data mortalitas diuji dengan Analisis Probit.